

コンカナバリンA投与マウス肝障害における抗炎症性サイトカイン、 インターロイキン10の関与

金沢大学医学部医学科内科学第一講座（主任：小林健一教授）

加 藤 充 朗

ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎などの肝障害においてはT細胞を介した細胞性免疫を主体とする肝細胞障害機序が考えられているが、その調節に関与する種々のサイトカインの役割については未だ十分に明らかにされていない。そこで今回、コンカナバリンA (concanavalin A, Con A) をマウスに投与する実験的肝障害モデルにおける各種サイトカイン、なかでも抗炎症性サイトカインとされるインターロイキン (interleukin, IL)-10の関与について検討した。6週齢、体重20gのBALB/c雌性マウスに対しCon A 0.5 μ gを尾静脈より静注し、肝障害モデルを作製した。投与前、およびCon A投与1, 3, 6, 12, 24時間後に採血を行い経時的にアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT) 値を測定するとともに、肝組織を採取して、組織障害の検討を行った。またELISA法を用いて腫瘍壊死因子 (tumor-necrosis factor, TNF)- α , IL-4, IL-10の測定を経時的に行った。血清ALT値はCon A投与3時間後より24時間後まで有意に上昇し、組織学的にも巣状壊死が認められ、軽度の肝障害が示唆された。TNF- α , IL-4は投与後早期より上昇した。IL-10は投与後早期および12時間後に二峰性に上昇した。また同モデルにおいてCon A投与量を0.2 μ gとし、マウスIL-10に対して中和活性を有する抗IL-10抗体1 μ gをCon A投与6時間前に腹腔内に注入し、Con A投与12時間後に血清ALT値の測定、および肝の組織学的検討を行った。ALT値は抗IL-10抗体投与群では130.7 \pm 33.5 IU/Lと抗体非投与群の56.5 \pm 3.5 IU/Lに比して有意に高値であった ($p < 0.05$)。また組織学的にも抗IL-10抗体投与群においては巣状壊死がみられた。以上の結果からCon Aを用いた細胞性免疫を介するマウス実験的肝障害モデルにおいて、IL-10が肝障害抑制的に作用することが示唆された。

Key words concanavalin A, interleukin-10, interleukin-4

ウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎の肝障害の発症機序は未だ十分に明らかにされていないものの、Tリンパ球を介した細胞性免疫が主体とされ¹⁾²⁾、その調節に各種サイトカインが関与すると考えられている^{3)~8)}。臨床例における詳細な検討が困難であることから、これまで種々の実験的肝障害モデルが提唱されてきたが、肝毒性のある薬物やエンドトキシンを用いたものが主であった。コンカナバリンA (concanavalin A, Con A) は、生体外にてリンパ球や単球を刺激し各種サイトカインを分泌させるレクチンの一種であり、マウスに投与することによって細胞性免疫を介した肝障害を誘導できることが知られており、臨床的な肝障害との類似性も示唆されている⁹⁾。

サイトカインは腫瘍壊死因子 (tumor-necrosis factor, TNF)- α 、インターフェロン (interferon, IFN)- γ 、インターロイキン (interleukin, IL)-1, IL-2, IL-12のいわゆる炎症性サイトカインとIL-4, IL-10といった抗炎症性サイトカインの2群に大別される^{6)~8)}。

そしてCon A誘導性実験的マウスにおける肝障害においても、上述のTNF- α やIFN- γ の炎症性サイトカインが肝障害の発現に関与していることが報告されている^{10)~12)}が、抗炎症性

サイトカインについては未だ十分な検討がなされていない。そこで本研究で、Con A誘導性マウス肝障害におよぼす抗炎症性サイトカインであるIL-10の影響について検討し、本モデルにおける免疫調節の関与について研究した。

材料および方法

I. 実験動物

実験には雌性、6週齢、体重約20gのBALB/cマウス（日本クレア、東京）を用いた。

II. 実験モデルの作製

カナバリア (Canavalia) 属のジャック豆 (Jack bean) より抽出されたCon A (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, USA) を使用した。6匹のマウスに対して各々Con A 0.5 μ gを生理食塩水0.5mlに溶解し尾静脈より静注した。Con A投与前、および投与1, 3, 6, 12, 24時間後に心臓から採血を行ない毎分3000回転、15分間の遠心分離により血清分離を行った。各時点の血清を用いてアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT) 値を、国際臨床化学連合法に準拠した酵素活性測定法によって測定した。同時に各時点においてマ

平成12年10月31日受付、平成12年12月13日受理

Abbreviations : ALT, alanine aminotransferase; Con A, concanavalin A; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; IFN, interferon; IL, interleukin; Th, helper T cell; LPS, lipopolysaccharide; MHC, major histocompatibility complex; P. acnes, Propionibacterium acnes; TNF- α , tumor necrosis factor- α

ウスの肝臓を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋をした後プレパレートを作製し、HE染色にて肝組織の検討を行った。

Ⅲ. 各種サイトカインの測定

ELISA法を用いて、各血清サイトカインの測定を行った。測定したサイトカインはTNF- α 、IL-4、IL-10であり、それぞれマウス TNF- α ELISA キット (Genzyme Corporation, Cambridge, USA)、マウス IL-4 ELISA キット (Bender MedSystems, Camarillo, USA) およびマウス IL-10 ELISA キット (Genzyme Corporation, Cambridge, USA) を用いた。

ELISA法は、96穴プラスチックプレートのウェルに1次抗体として各サイトカインに対する未標識ラット抗マウスモノクローナル抗体を入れ、被験血清を加えて結合させ洗浄、2次抗体として羊抗ラットモノクローナル抗体を添加、洗浄した後ビオチン標識羊ポリクローナル抗体を加え、ペルオキシダーゼ結合ストレプタビジン (streptavidin- peroxidase) にて標識し、450nmの吸光度を測定した。これを既知濃度のサイトカインにより作製した標準曲線と比較することによって濃度を算出した。各キットの測定限界は、TNF- α が15 pg/ml、IL-4 が5pg/ml、IL-10が15pg/mlである。

Ⅳ. Con A誘導性実験的肝障害におけるIL-10の関与の検討

BALB/cマウスに対し、前述の如く作製したCon A誘導性実

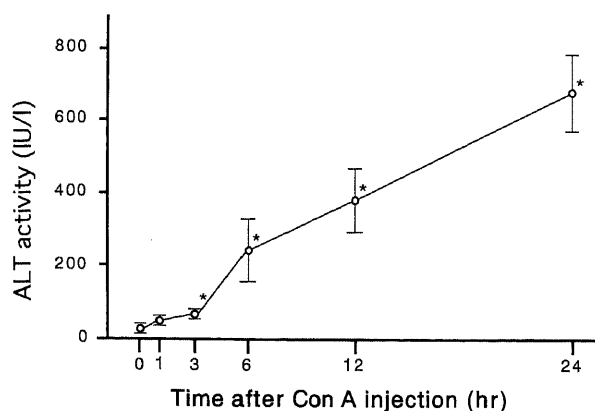


Fig. 1. Serial change in serum ALT activity after the Con A injection. * $p < 0.05$, compared with the value before injection by Student's t-test.

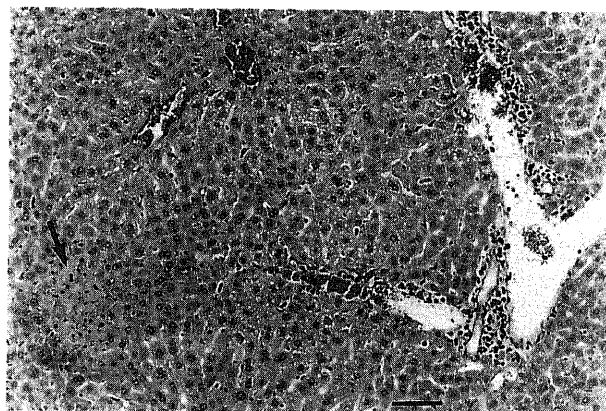


Fig. 2. Histological findings of the liver from mice at 24 hr after the Con A injection (Hematoxylin-eosin staining). Spotty necrosis was present in the liver lobe (arrow). Scale bar, 100 μ m.

験的肝障害モデルにおいて、6匹に対してCon A投与6時間前に抗IL-10抗体 (Genzyme Corporation, Cambridge, USA) 1 μ gを生食0.5mlに溶解し腹腔内に注入 (抗IL-10抗体併用群) し、他に10匹に対し生食0.5mlを腹腔内に注入する対照群を設定した。

なお、使用した抗IL-10抗体は組換え型マウスIL-10に対するラットのモノクローナルIgG1である。

Con A投与12時間後、採血を行い血清分離の後、ALT値を測定するとともに、Con A投与12時間後に肝組織を採取して肝の

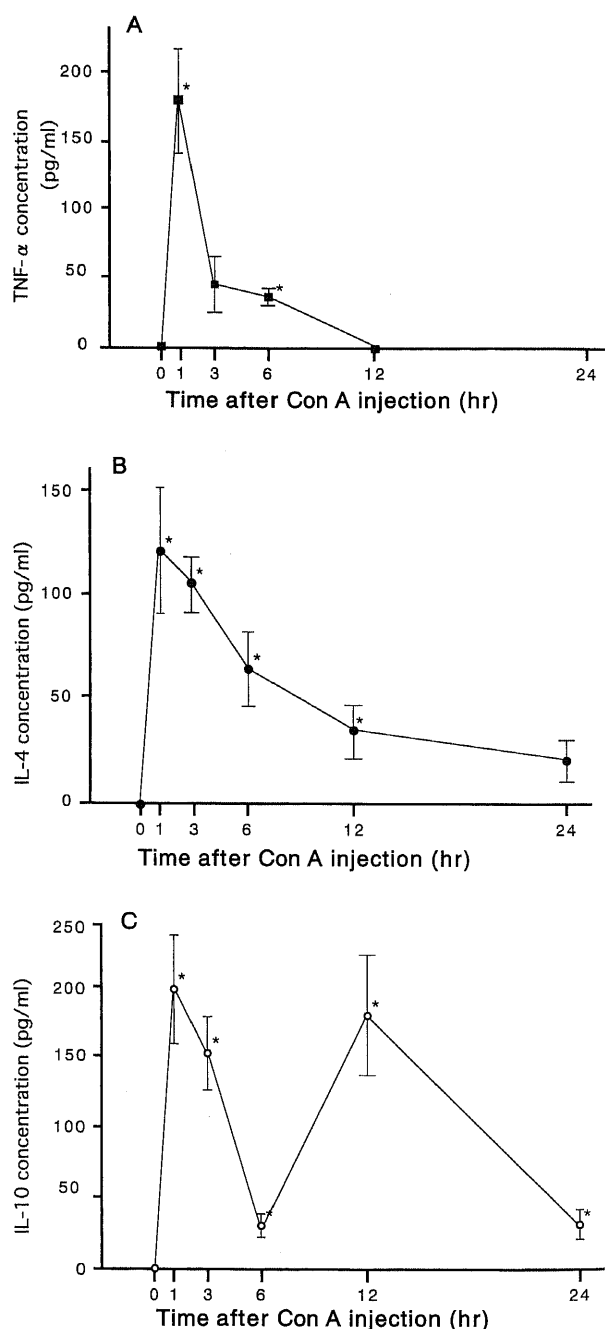


Fig. 3. (A) Serial change in serum TNF- α concentration after the Con A injection. (B) Serial change in serum IL-4 concentration after the Con A injection. (C) Serial change in serum IL-10 concentration after the Con A injection. * $p < 0.05$, compared with the value before injection by Student's t-test.

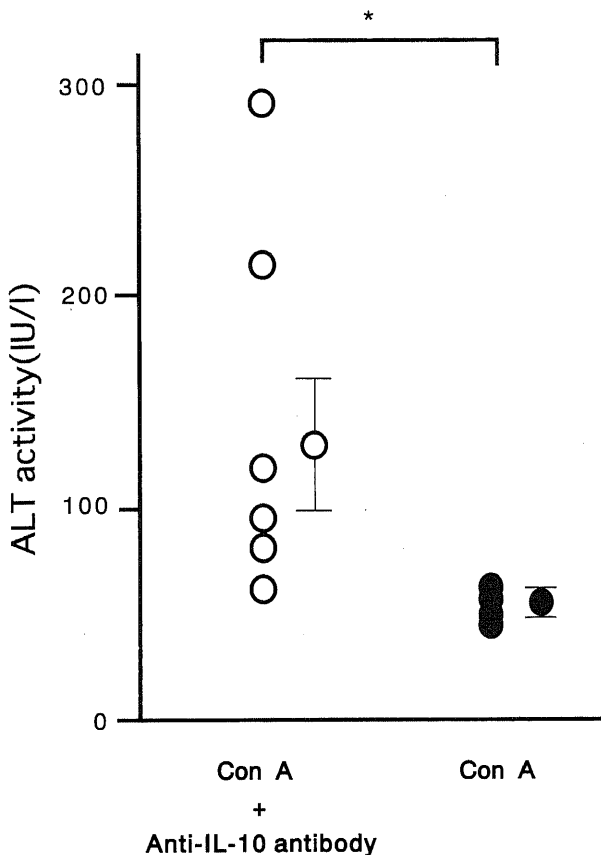


Fig. 4. ALT activities at 12 hr after the Con A injection between the group with anti-IL-10 antibody and that without anti-IL-10 antibody. Data are shown as $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$ vs the group administered Con A only by Student's t-test.

組織学的検討を行った。

なおこの検討では、通常投与法で肝障害が生じないようにする目的でCon A投与量をマウス1匹あたり0.2 μg とした。

V. 統計学的処理

数値はすべて $\bar{X} \pm \text{SEM}$ で表記した。血清肝酵素値の変化の検定にはPairedのt検定を用いた。いずれの場合も危険率5%未満をもって有意差ありと検定した。

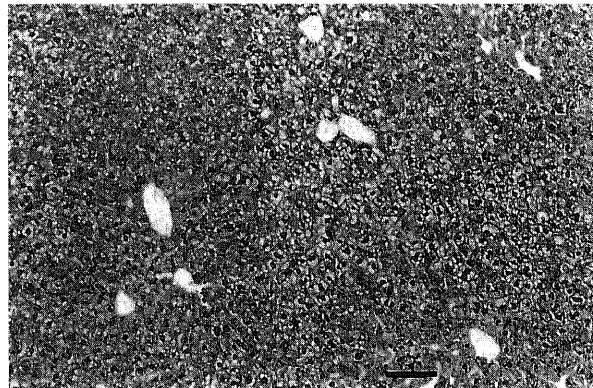
成 績

I. Con A投与によるマウス肝障害モデルの作製

前述したように作製されたマウス実験的肝障害モデルにおけるCon A投与後の血清ALT値の変化を図1に示す。Con A投与前 33.9 ± 4.7 IU/lで、投与1時間後では 47.9 ± 7.4 IU/lと有意差は認められなかったが、投与3時間後には 68.4 ± 2.2 IU/lと投与前と比較して血中ALT値の有意な上昇 ($p < 0.05$) が認められ、以後投与6時間後 237.7 ± 83.3 IU/l、12時間後 382.2 ± 85.4 IU/l、さらに24時間後 674.8 ± 120.0 IU/lと持続的に有意な(いずれも $p < 0.05$)上昇が認められた。

図2はCon A投与24時間後の肝組織像を示す。矢印に示すように巣状壊死が認められたことより軽度の肝細胞障害が示唆された。

A



B

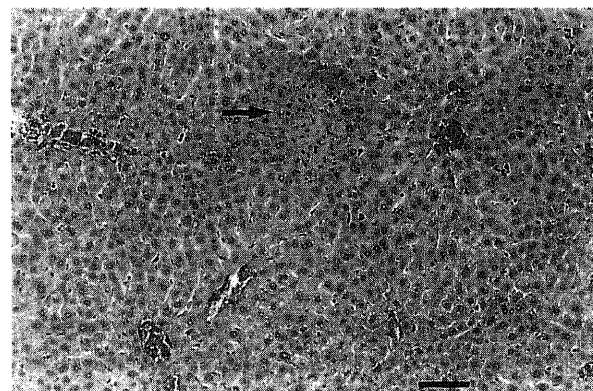


Fig. 5. (A) Histological findings of the liver from mice administered Con A only (Hematoxylin-eosin staining). At twelve hr after Con A injection, no significant change was detected. Scale bar, 100 μm . (B) Histological findings of the liver from mice administered Con A plus anti-IL-10 antibody (Hematoxylin-eosin staining). At 12 hr after Con A injection, edematous change and spotty necrosis (arrow) were detected in the liver lobule. Scale bar, 100 μm .

II. Con A誘導マウス肝障害におけるサイトカイン濃度の変動

図3はCon A投与後の血中TNF- α 、IL-4、IL-10濃度の各々の変化を示す。炎症性サイトカインのうちTNF- α は投与前測定感度以下から投与1時間後には 179.5 ± 38.1 pg/mlと有意に上昇 ($p < 0.05$) し、3時間後 45.9 ± 16.3 pg/ml、6時間後 35.5 ± 5.2 pg/ml ($p < 0.05$) と低下し、12時間後には測定感度以下 ($p < 0.05$) となった(図3A)。

IL-4については、Con A投与前の測定感度以下から1時間後には 121.9 ± 29.4 pg/mlまで有意に上昇 ($p < 0.05$) し、3時間後 107.0 ± 13.1 pg/ml、6時間後 61.0 ± 18.2 pg/ml ($p < 0.05$)、12時間後 34.2 ± 12.2 pg/mlと低下した。しかし24時間後においても 20.1 ± 10.5 pg/mlと投与前に比べ高値を持続していた(図3B)。次にIL-10は投与前の測定感度以下から投与1時間後には 198.8 ± 35.4 pg/mlと上昇 ($p < 0.05$) し、その後3時間後 150.5 ± 27.2 pg/ml、6時間後 30.9 ± 9.2 pg/ml ($p < 0.05$) とTNF- α 、IL-4と同じく低下を示したものの、12時間後に 179.6 ± 43.7 pg/ml

と再び有意に上昇($p<0.05$)する2峰性の変化を示し、24時間後には $30.8 \pm 10.0 \text{ pg/ml}$ ($p<0.05$)と再度低下が認められた(図3C)。

Ⅲ. Con A誘導性マウス肝障害モデルにおける抗IL-10抗体投与による変化

Con A投与12時間後における抗IL-10抗体併用群と抗体非投与群の血中ALT値を示す。ALT値は、抗IL-10抗体併用群では $130.7 \pm 33.5 \text{ IU/l}$ 、抗体非投与群で $56.5 \pm 3.5 \text{ IU/l}$ と、抗IL-10抗体併用群で有意に高値であった($p<0.05$)(図4)。

次にCon A投与12時間後の両群の肝組織像を比較すると、図5Aに示すように、抗体非投与群では明らかな異常所見は認められなかったのに対し、抗体併用群では図5Bに示すように、巣状壊死(矢印)が認められたことから、組織学的により高度の肝細胞障害が示された(図5)。

これらの所見より、Con A誘導性マウス肝障害モデルにおいては抗IL-10抗体の併用により肝障害が増悪することが示唆された。

考 察

Con Aはレクチンの一種で、肝などの細胞表面の糖質に選択的に結合する性質を有しており、肝組織内でT細胞やマクロファージを刺激し、細胞性免疫誘導を活性化することによって肝障害を誘導することが知られ、Con A肝障害マウスは免疫を介する実験モデルとして用いられている⁹⁾。

CD4陽性のヘルパーT細胞(helper T cell, Th)はマウスではそのサイトカイン産生パターンから主にTh1, Th2およびTh0の3つに分類できることが知られている⁶⁾。Th1細胞はIL-2, IFN- γ を産生し主に遅延型過敏反応やウイルス感染細胞の除去、移植片拒絶などの細胞性免疫に重要と考えられ、Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13などのサイトカイン産生により細菌などの除去やアレルギー反応など主に抗体産生による液性免疫に関与している。Th0細胞はそれらTh1/Th2細胞への分化への前段階と考えられており、Th1/Th2タイプ両方のサイトカインを産生すると考えられている⁶⁾⁷⁾。石田ら⁸⁾は遅延型過敏反応を基盤とする臓器特異的自己免疫疾患や炎症性疾患はTh1優位の免疫応答で病態が形成され、全身性自己免疫疾患やI型アレルギーはTh2優位の免疫応答で病態が形成されるという理論を提唱している。

マウスCon A誘導肝障害においてはTNF- α 、IFN- γ といった炎症性サイトカインが上昇することが報告されており^{10)~12)}、さらにTNF- α 、IFN- γ の作用を抗体によって阻害することによって肝障害が抑制されることが示されている¹³⁾¹⁴⁾。このことから、これら炎症性サイトカインがマウスCon A誘導性肝障害の発症あるいは促進に関与していることが考えられる。このうちTNF- α は細胞の生理的細胞死、アポトーシス(apoptosis)の促進や細胞分裂の抑制作用を有し¹⁰⁾、IFN- γ はマクロファージあるいはナチュラルキラー(natural killer)細胞の活性、増殖、分化の誘導、促進、および主要組織適合抗原(major histocompatibility complex, MHC)クラスIIの発現の促進などにより肝障害に関与すると考えられている¹¹⁾。

肝炎ウイルス特異的細胞障害性T細胞による肝組織障害の機序を検討するため、B型肝炎ウイルストランジェニックマウスを用いた研究が行われている²⁾。その結果、肝炎肝組織の細胞障害性T細胞の数が肝細胞の数に比べ極めて少なく、細胞障害性T細胞が肝炎ウイルス感染細胞を1:1に認識し、肝障害を

生じるという考えは否定的であった。むしろ細胞障害性T細胞が肝炎ウイルス感染細胞を認識した結果、その後に続く組織障害をおこす一連の応答の引き金を引くことにより肝組織障害を生じると考えられている。

その肝炎の発症の過程において各種サイトカインの関与が報告されている^{1)~5)}。すなわち、肝炎ウイルス感染による肝障害の機序の第一段階として、抗原提示細胞により処理され、MHCクラスII抗原により提示された外因性の肝炎ウイルス抗原を認識したTh1型ヘルパーT細胞が産生するIFN- γ 、IL-2、その他TNF- α 、IL-1といった炎症性サイトカインが関与し、HLAクラスI抗原により提示された肝炎ウイルス抗原を認識する細胞障害性T細胞の活性化を促すことが考えられている。一方、肝炎の発症に関しては炎症性サイトカインだけでなく、IL-4、IL-10といった抗炎症性サイトカインの関与も考えられている¹⁵⁾。しかしこの炎症性サイトカインに相対する抗炎症性サイトカインの肝炎発症における関与については未だ明かではない。

IL-4はTh2型CD陽性T細胞由来で、B細胞の増殖、IgG、IgE産生細胞への分化を誘導し、単球/マクロファージに対しTNF- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-8などのサイトカイン産生の抑制、食食能および活性酸素産生の抑制作用を有し、またTh1型細胞に対して増殖抑制、Th2型細胞には増殖促進に作用する抗炎症性サイトカインである^{16)~18)}。しかし今回使用したCon A誘導性マウス実験的肝障害モデルにおいてはIL-4が肝障害の誘発作用のひとつであるとの報告¹⁹⁾もあり、必ずしも肝障害に対し抑制的にのみ作用するものではないことが示唆されている。

IL-10は1989年にFiorentinoら²⁰⁾によりマウス長期継代細胞株において、IL-4とともにTh2細胞から産生されTh1細胞によるIFN- γ の産生を抑制する「サイトカイン産生抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor)」として同定された。IL-10の産生細胞としてはTh2細胞の他、Ly1+(CD5+)B細胞、マクロファージ、肥満細胞、ケラチノサイト、腫瘍細胞(卵巣癌、膠芽腫)などが判明しており、肝組織においては主としてクッパー細胞から産生されるといわれている²¹⁾²²⁾。その生物活性は刺激性活性と抑制性活性に大別されるが、Th0/Th1細胞の増殖抑制、Th1型T細胞やNK細胞からのIFN- γ 、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生抑制、単球系細胞におけるMHC class IIの発現の抑制、マクロファージの活動性の抑制作用によって細胞性免疫を抑制するとされている^{23)~29)}。Tompsonら³⁰⁾は、肝星状細胞(hepatic stellate cell)をIL-1、TNF- α といった炎症性サイトカインにて刺激した実験でIL-10が産生されたと報告し、IL-10の産生機序のひとつとして炎症性サイトカインの産生に対する反応が考えられることを示唆した。Hoら³¹⁾はIL-10がマクロファージにおけるIFN- γ レセプターに作用することにより、マクロファージの活動性を抑制する可能性を示唆しており、これがIL-10による抑制性活性の機序の一つと考えられる。

Araiら³²⁾はリポポリサッカライド(lipopolysaccharide, LPS)およびプロピオンバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*, P. acnes)を併用投与して作製したマウス肝障害モデルにおいてIL-10の上昇が認められ、抗IL-10抗体投与により肝障害の増悪が認められたと報告した。このモデルはマクロファージから産生されるTNF- α に依存する炎症として報告され³²⁾³³⁾、IFN- γ も強く関与していることが明かとなっている³⁴⁾。別の報

告にてAraiら³⁵⁾はサルモネラ菌感染マウスに対する抗IL-10抗体の投与後、TNF- α 、IL-1、IFN- γ の産生の亢進を認めた。Louisら³⁶⁾はガラクトサミン(galactosamine)およびLPSの併用によるマウス肝障害モデルに対し抗IL-10抗体投与をおこない、非投与群と比較して血中ALT値の有意な上昇を認め、同時に血中TNF- α 値の有意な上昇も認められたと報告した。Wagnerら³⁷⁾はリステリアモノサイトゲン(*Listeria monocytogene*)によるマウス肝障害モデルに対し抗IL-10抗体投与をおこない、血中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspartate aminotransferase)高値の持続および組織学的な肝障害の増悪を認めたと報告した。また同肝障害モデルにてTNF- α およびIFN- γ のメッセンジャーRNAの上昇が認められ、抗IL-10抗体投与によって、このうちIFN- γ のメッセンジャーRNA値が上昇を認めたとの結果を示している。これらの報告から、IL-10がTNF- α あるいはIFN- γ の産生または作用を抑制することによって肝障害抑制に働く可能性が考えられている。

今回の検討により、Con A誘導性マウス実験的肝障害モデルにおいてもTNF- α 、IL-4およびIL-10の上昇が認められ、抗IL-10抗体を用いてIL-10の作用を阻害することによって肝障害の増悪が認められたことから、IL-10は細胞性免疫を介するとされるこのCon A誘導性肝障害モデルにおいても肝障害に対して抑制的に作用するものと考えられた。

用いたマウスは異なるもののLouisら³⁸⁾は、C3H/HeJマウスを用いたCon A誘導性マウス実験的肝障害モデルにおいて、抗IL-10抗体の投与にて肝障害が増悪し、その際TNF- α 、IFN- γ の産生が亢進したと報告している。また同じモデルにて、組換え型IL-10を投与することによってTNF- α 、IFN- γ の産生が抑制されたことも示しており、C3H/HeJマウスを用いたCon A誘導性マウス実験的肝障害モデルにおけるIL-10のTNF- α 、IFN- γ 産生抑制効果を示唆されている。なお、この検討にて使用されたC3H/HeJマウスと今回我々が使用したBALB/cマウスではLPS刺激³⁹⁾あるいはダニ属(*Ixodes scapularis*)やボレリア(*Borrelia burgdorferi*)感染⁴⁰⁾に対するT細胞の反応、またはマイコバクテリウム(*Mycobacterium paratuberculosis*)感染による肝組織の障害度⁴¹⁾が異なるが、Con A誘導性マウス実験的肝障害モデルにおける炎症性および抗炎症性サイトカインの変化に関してはC3H/HeJマウスとBALB/cマウスは同様の反応を示したと考えられた。

今回の検討ではCon A投与により血中IL-10値は二峰性の上昇を示し、Louisら³⁸⁾の報告においても同様の変化が認められた。Knolleら²²⁾は、エンドトキシンを用いたヒトのクッパー細胞およびマウスの刺激試験の結果より、エンドトキシン投与後早期にはクッパー細胞から、後期には循環血中の単核細胞からIL-10が産生されていると考察している。

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus, HCV)に対する排除作用におけるTh細胞の役割に関しては、C型急性肝炎においてHCVに対する充分なTh1細胞応答が見られた場合はHCV感染は一過性感染で終わり、持続感染には移行しないことが報告されている¹⁾。一方、C型慢性肝炎患者においてはTh1からのIFN- γ 、IL-2の他、Th2細胞から産生されるIL-4、IL-10の上昇も認められている⁴⁾、²⁸⁾、⁴²⁾。Tsaiら²⁸⁾は、C型慢性肝炎において順調に経過した例の末梢血T細胞はHCVの各領域の蛋白刺激に対し良好な細胞増殖反応、およびIL-2とIFN- γ のTh1型優位のサイトカインを分泌し、慢性化例ではIL-4とIL-10のTh2型

サイトカインを産生していたと報告している。

石田⁴³⁾はC型慢性肝炎のインターフェロン投与例において有効群が無効群に対し血清IL-10濃度が有意に高値を示したと報告している。しかし大川ら⁴⁴⁾は逆に、同様の検討にて有効群に比較し無効群では血清IL-10値が有意に高値を示したと報告し、Kakumuら⁴⁵⁾はC型慢性肝炎患者の末梢単核球をCon Aにて刺激した場合、対照に比較し有意にIL-10の産生が亢進し、IFN治療の無効群において有効群や対照群にくらべ産生能が有意に高いと報告している。石田⁴⁶⁾はC型慢性肝炎の治療のためIFN- α を投与した症例の血中IL-10を測定し、外因性のIFN- α により内因性のIL-10産生が誘導されたと報告した。これについて石田は高IL-10、低IFN- γ 状態によりB細胞の活性が促進され、B細胞から産生される抗体により抗体依存性細胞障害や補体依存性細胞障害により感染細胞を破壊、放出されたウイルスに中和抗体が作用しウイルスの排除が完成すると考察している。しかし一方でCacciarelliら⁴⁾はC型慢性肝炎に対しIFN- α を投与した症例で同様の検討を行い、血清IL-4、IL-10濃度が減少したと報告し、IFN- α の治療効果のひとつとしてTh2系サイトカインを抑制することによってT細胞の活動性を促し、ウイルスの排除につながると考察している。このように、C型慢性肝炎におけるIFN治療の治療効果とIL-10の作用との関連についてはなお結論が出されておらず、IFN- α 治療に対するIL-10の反応が単一ではないことも考えられる。

また漢方薬である小柴胡湯をC型慢性肝炎に投与した後、IL-10の産生能が亢進し、これがC型慢性肝炎に対する治療効果のひとつである可能性についての報告もある⁴⁷⁾。

Vingerhoetsら⁴⁸⁾は、B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus, HBV)感染症例の末梢血の単核球をHBVコア抗原あるいはHBVエンベロープ抗原にて刺激したところIFN- γ とともにIL-10の産生が亢進し、このモデルにて抗IL-10抗体にてIL-10を中和したところIFN- γ の産生が抗IL-10抗体非投与症例に比べ有意に亢進し、TNF- α 濃度には変化は無かったと報告した。また同じ報告にて抗IL-4抗体投与によるIL-4中和ではIFN- γ の産生に変化は無かったとしている。B型慢性肝炎においてはC型慢性肝炎に比べ、健常者と比較したIFN- γ の上昇が軽度である⁴⁹⁾が、HBV感染マウス(HBV surface antigen transgenic mouse)の肝細胞におけるIFN- γ の障害作用に対する特異的な感受性が亢進している⁵⁰⁾ことから、IL-10がIFN- γ の作用を抑制することによってHBVによる肝障害を抑制している可能性が考えられる。

また原発性胆汁性肝硬変および自己免疫性肝炎症例においてT細胞からのIL-10産生能がBおよびC型慢性肝炎症例より著明に亢進しているとの報告もある⁵¹⁾、⁵²⁾。

これらの報告からIL-10は細胞性免疫を抑制することによって肝炎に対し抑制的な作用を示す可能性が考えられるが、ウイルス性肝炎の持続、進行および治療効果への関与に関してはなお検討が必要と考えられる。

また、IL-10遺伝子除去マウス(IL-10 gene knock out mouse)に対し四塩化炭素(carbon tetrachloride)を投与したモデルではIL-10正常マウスに比べ肝組織の線維化が亢進しているとの報告がなされており⁵³⁾、⁵⁴⁾、慢性肝炎から肝硬変への進展あるいは肝細胞癌の発生にIL-10が関与している可能性も考えられている。

近年、LPS誘発内毒素性ショックマウスモデルに組換え型マ

ウスIL-10を投与すると、用量依存性に有意に生存率が改善し⁵⁵⁾、この際、炎症性サイトカインであるIL-1, IL-6, TNF- α の上昇が抑制される^{55)~57)}ことが報告されている。また盲腸を結紮穿刺して作製したマウス穿孔性腹膜炎モデルでも同様の検討がおこなわれ⁵⁵⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾、組換え型マウスIL-10投与後に用量依存性に有意な生存率の改善が報告されている。この際IFN- γ , IL-158), IL-6, TNF- α ⁵⁵⁾⁵⁹⁾の産生が抑制され、またこのモデルに対し抗IL-10抗体を投与したところ有意に生存率が低下したとの報告がなされている⁵⁹⁾。ただしIL-10投与ではP. acnesおよびLPS併用による内毒素性ショックは抑制できるが、内毒素性肝障害は阻止できないとの報告もあり⁶⁰⁾、全身性炎症反応の抑制が局所の炎症反応の抑制と一致しない可能性が示唆されている。

また、IL-10による肥満細胞、好酸球、T細胞の活動を抑制することによる抗I型アレルギーの抑制作用が証明され⁶¹⁾⁶²⁾、アレルギー性疾患へのIL-10の投与が検討されている⁶³⁾。

若杉ら⁶⁴⁾は肝および胃癌組織よりIL-10の発現が認められ、肺癌細胞にIL-10cDNAを導入したところ腫瘍増殖性の有意な亢進が認められたと報告しており、松原ら⁶⁵⁾⁶⁶⁾はマウス癌性腹膜炎モデルに対し抗IL-10抗体を免疫療法と併用投与したところ、著明な腹水形成の遅延と生命予後の延長が認められたと報告し、IL-10制御を併用することによるTh1/Th2バランスの制御が治療効果につながったと考察している。これらのことから、IL-10は癌の発現および増殖に対しては促進作用を有し、IL-10の抑制が癌の制御につながる可能性が示唆されている。

このようにIL-10の治療への応用はすでに考案されており、今後さらにIL-10と肝障害との関連について、特に治療への応用という点において検討を要すると考えられた。

結 論

Con A誘導性実験的マウス肝障害における血中サイトカインの動態について検討をおこない、次の結論が得られた。

1. Con A投与後早期に血中TNF- α , IL-4, IL-10濃度の有意の上昇が認められた。TNF- α , IL-4はその後低下を示したものの、IL-10濃度は一旦低下後再上昇し二峰性の変化が認められた。

2. Con A投与前にIL-10に対して中和活性を有する抗IL-10抗体を投与したところ、非投与群に比べ血中ALT濃度が有意に高値となり、組織障害の程度も高度となった。

これらのことからCon A誘導性実験的マウス肝障害においては、IL-10が肝障害に対し抑制的に作用すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接御指導を賜りました第一内科金子周一助教授に心から感謝いたします。さらに、本研究に終始御協力と御援助をいただきました池田直樹先生他金沢大学第一内科第二研究室の諸先生方に深謝いたします。

文 献

1) Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in hepatitis C virus infection. *Lancet* 346: 1006-1007, 1995

2) Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang S, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 178: 1541-1554, 1993

3) Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McGaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 24: 759-765, 1996

4) Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: Pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology* 24: 6-9, 1996

5) Bertolotti A, D'Elios MM, Boni C, Carli MD, Zigenego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Prete GD, Ferrari C. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 112: 193-199, 1997

6) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173, 1989

7) 中島敦雄, 東みゆき. Th1/Th2活性化における costimulation (CD80/CD86)の相違. *臨床免疫* 28: 1105-1111, 1996

8) 石田 博, 柳田英寿. Tr1によるTh1/Th2バランスの調節. *臨床免疫* 30: 1479-1485, 1998

9) Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 90: 196-203, 1992

10) Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21: 190-198, 1995

11) Mizuhara H, Uno M, Seki N, Yamashita M, Yamaoka M, Ogawa T, Kaneda T, Fujii T, Senoh H, Fujiwara H. Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 23: 1608-1615, 1996

12) Chowdhury MGM, Maeda K, Yasutomo K, Maekawa Y, Furukawa A, Azuma M, Nagasawa H, Himeno K. Antigen specific B cells are required for the secondary response of T cells but not for their priming. *Eur J Immunol* 26: 1628-1633, 1996

13) Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 175: 1213-1220, 1992

14) Knolle PA, Gerken G, L & ser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, B %schenfelde KHM, Lohse AW. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 24: 824-829, 1996

15) Kustner S, Gantner F, Kunstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 111: 462-471, 1996

16) Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and inter-

- leukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 23: 3043-3049, 1993
- 17) Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46: 111-116, 1989
- 18) Loyer P, Ilyin G, Razzak ZA, Banchereau J, Dezier JF, Campion JP, Guillouzo CG, Guillouzo A. Interleukin 4 inhibit the production of some acute-phase proteins by human hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett* 336: 2, 215-220, 1993
- 19) 矢野聖二, 遠藤 健, 曾根三郎. IL-4, IL-13, TGF- β . 炎症と免疫 3: 577-583, 1995
- 20) Fiorentino D, Bond M, Mossmann TR. Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 239-247, 1995
- 21) 鳥谷部真一, 関 修司, 安保 徹. Concanavalin A誘発肝炎モデルにおけるNK1+T細胞由来IL-4の役割. *Minophagen medical review* 42: 314-318, 1997
- 22) Knolle PA, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Buschenfelde KHM, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide(LPS) challenge. *J Hepatol* 22: 226-229, 1995
- 23) Knolle PA, Uhrig A, Protzer U, Trippler M, Duchmann R, Büschenfelde KHM, Gerken G. Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology* 27: 93-99, 1998
- 24) Howard M, O'Garra A, Ishida H, Malefyt RW, Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 12: 239-247, 1992
- 25) 石田 博. IL-10の生物学. 炎症と免疫 1: 367-375, 1993
- 26) 石田 博, 太田博之. IL-10. 炎症と免疫 3: 584-592, 1995
- 27) Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lennemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. *J Immunol* 154: 5492-5499, 1995
- 28) Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatic C virus infection: Implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25: 449-458, 1997
- 29) Moine OL, Marchant A, De Groote D, Donat DG, Azar Camille, Goldmann M, Deviere J. Role of defective mono-cyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor- α overproduction in alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 22: 1436-1439, 1995
- 30) Tompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJP, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine Interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology* 28: 1518-1524, 1998
- 31) Ho ASU, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Banzan JF, Moore KW. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11267-11271, 1993
- 32) Arai T, Hiromatsu K, Kobayashi N, Takano M, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. IL-10 is involved in the protective effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury. *J Immunol* 155: 5743-5749, 1995
- 33) Tsutsui H, Mizoguchi Y, Morisawa S. Importance of direct hepatocytolysis by liver macrophages in experimental fulminant hepatitis. *Hepatogastroenterology* 39: 553-559, 1992
- 34) 田中善孝, 高橋晶子, 高山喜好, 渡辺一仁, 西村孝司. 肝障害発症におけるIL-12の役割. 免疫と炎症 5: 244-251, 1997
- 35) Arai T, Hiromatsu K, Nisimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. Effect of in vivo administration of anti-IL-10 monoclonal antibody on the host defence mechanism against murine Salmonella infection. *Immunology* 85: 381-388, 1995
- 36) Louis H, Moine OL, Peny MO, Gulbis B, Nisolf F, Goldman M, Deviere J. Hepatoprotective role of Interleukin 10 in Galactosamine/Lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 112: 935-942, 1997
- 37) Wagner RD, Maroushek NM, Brown JF, Czuprynski CJ. Treatment with anti-Interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect Immun* 62: 2345-2353, 1994
- 38) Louis H, Moine OL, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 25: 1382-1389, 1997
- 39) Rampioni PA, Jutila JW. Influence of lipopolysaccharide on Graft Versus Host Reactivity of lipopolysaccharide-unresponsive C3H/HeJ mice. *Infect Immun* 26: 137-142, 1979
- 40) Zeidner N, Mbow ML, Dolan M, Massung R, Baca E, Piesman J. Effect of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: Induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect Immun* 65: 3100-3106, 1997
- 41) Tanaka S, Sato M, Taniguchi T, Yokomizo Y. Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in Balb/c and C3H/HeJ mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 110: 381-388, 1994
- 42) Reiser M, Marousis CG, Nelson DR, Lauer G, Peraluta RPG, Davis GL, Lau JYN. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 26: 471-478, 1997
- 43) 石田博. サイトカインネットワークの中でのインターフェロン. 治療学 27: 1179-1184, 1993
- 44) 大川康彦, 高橋宏樹, 相沢良夫, 銭谷幹男, 新 智文, 榎本康之, 奥 田丈二, 蔵本 暁, 小池和彦, 深田弘幸, 林 昭太, 石川智久, 奥秋 靖, 唐沢達信, 都野晋一, 穂苅厚志, 坂口正巳, 原 正樹, 河辺朋信, 根岸正史, 清水能一, 伊坪真理子, 戸田剛太郎. C型慢性肝炎におけるインターフェロン治療による血清IL-1raおよびIL-10の経時的変化. 消化器と免疫 30: 155-159, 1995
- 45) Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, Yoshioka K. Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic

- hepatitis C virus (HCV) infection. Clin Exp Immunol 108: 138-143, 1997
- 46) 石田 博. インターフェロン治療中のC型慢性肝炎のウイルス量の動態についての検討. 新薬と臨床 45: 1500-1504, 1996
- 47) 山浦昌由, 西村 晃, 斉藤純夫, 渡辺東盟, 野本 実, 尾崎俊彦, 石原 清. C型慢性肝炎患者における末梢血単核球のIL-10産生能と, それに及ぼす小柴胡湯の影響について. 漢方医学 21: 84-89, 1997
- 48) Vingerhoets J, Michielsens P, Vanham G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, Pelckmans P, Kestens L, Leroux-Roels G. HBV-specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. J Hepatol 28: 8-16, 1998
- 49) Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. J Infect Dis 175: 681-685, 1997
- 50) Gilles PN, Guerrette DL, Ulevitch RJ, Schreiber RD, Chisari FV. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of Interferon- γ . Hepatology 16: 655-663, 1992
- 51) Krams SM, Cao S, Hayashi M, Villanueva JC, Martinez OM. Elevations in IFN- γ , IL-5, and IL-10 in patients with the autoimmune disease primary biliary cirrhosis: Association with antibodies and soluble CD30. Clin Immunol Immuno-pathol 80: 311-320, 1996
- 52) Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G, Fleischer B, Dienes H-P, Meyer zum B (schenfelde K-H. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. Liver 14: 161-166, 1994
- 53) Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. Hepatology 28: 1597-1606, 1998
- 54) Louis H, Laethem JLV, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Berg KVD, Demols A, Goldman M, Moine OL, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetra-chloride in mice. Hepatology 28: 1607-1615, 1998
- 55) 石田 博, 太田博之. 重症炎症性疾患モデルマウスに体するIL-10の治療効果の検討. 炎症 15: 389-394, 1995
- 56) Howerd M, Muchamuel T, Andrade, Andrade S, Menon. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. J Exp Med 177: 1205-1208, 1993
- 57) Drăzan KE, Wu L, Bullington D, Shaked A. Viral IL-10 gene therapy inhibits TNF- α and IL-1 β , not IL-6, in the newborn endotoxemic mouse. J Pediatr Surg 31: 411-414, 1996
- 58) Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL, Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. J Immunol 155: 5397-5401, 1995
- 59) Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. Infect Immun 64: 4733-4738, 1996
- 60) 筒井ひろ子, 松井 聖, 中西憲司, 東野一彌, 河田則文, 井上正康. Interleukin 10はなぜエンドトキシン肝障害を阻止できないのか? 薬理と治療 24: 15-19, 1996
- 61) Bejarano MT, Malefyt RDW, Abrams JS, Bigler M, Bacchetta R, Vries JED, Roncarolo MG. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. Int Immunol 4: 1389-1397, 1992
- 62) Ferguson TA, Dube P, Griffith TS. Regulation of contact hypersensitivity by Interleukin 10. J Exp Med 179: 1597-1604, 1994
- 63) 石田 博, 柳田英寿, 堤 健雄. IL-10によるアレルギー性炎症の制御. 臨床免疫 30: 1265-1272, 1998
- 64) 若杉慎治, 広瀬国孝, 小川健治, 勝部隆男, 三浦一浩, 梶原哲郎. 免疫抑制性サイトカイン遺伝子導入がん細胞の腫瘍増殖性に関する検討. Biotherapy 11: 455-457, 1997
- 65) 桧原 淳, 山口佳之, 峠哲哉. 担癌状態におけるTh1/Th2バランスと免疫療法. 臨床免疫 30: 471-477, 1998
- 66) 桧原 淳, 山口佳之, 宮原栄治, 野間浩介, 川見弘之, 佐藤幸雄, 沢村明広, 峠 哲哉. IL-10制御によるがん局所免疫療法の効果増強. Biotherapy 11: 762-768, 1997

Cytokine Profiles of an Experimental Model of Cell Immunity-Mediated Liver Injury Mitsuro Kato, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **109**, 403 — 411 (2000)

Key words concanavalin A, interleukin 4, interleukin 10

Abstract

A mechanism of liver injury such as viral hepatitis or autoimmune hepatitis is considered to involve the impairment of hepatocytes mainly mediated by T-cell immunity, but the roles of a variety of cytokines involved in regulation remain unclarified. We investigated the involvement of various cytokines, particularly, interleukin-10 (IL-10) which is considered an anti-inflammatory cytokine, in a murine model of experimental liver injury induced by concanavalin A (Con A). The model of liver injury was made by an intravenous injection of 0.5 μ g of Con A through the caudal vein in 6-week-old female BALB/c mice weighing 20 grams. By collecting blood before and at 1, 3, 6, 12 and 24 hr after the injection of Con A, alanine aminotransferase (ALT) levels were sequentially measured, and liver tissue was sampled to examine liver injury. Furthermore, TNF- α , IL-4 and IL-10 levels were sequentially determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum ALT significantly increased between 3 and 24 hr after the Con A injection, and spotty necrosis was histologically observed, suggesting mild liver injury. TNF- α and IL-4 increased soon after the injection of Con A. IL-10 was increased bimodally soon after and at 12 hr after the injection of Con A. After neutralizing antibodies to IL-10 were intraperitoneally injected (1 μ g) into the same model at 6 hr before Con A treatment, serum ALT levels and histological examination of the liver were examined at 12 hr after the Con A injection. ALT was significantly higher in the group treated with anti-IL-10 antibody (130.7 ± 33.5 IU/l) than in the non-treated group (56.5 ± 3.5 IU/l) ($p < 0.05$). Histological examination showed spotty necrosis in the group treated with anti-IL-10 antibody. These results suggest that IL-10 has an inhibitory effect on liver injury in a murine model of Con A-induced experimental liver injury mediated by cellular immunity.